

University of Groningen

Antigen-driven antibody responses

Schilizzi, Bridget Mary

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1997

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Schilizzi, B. M. (1997). Antigen-driven antibody responses: studies for in vitro immunisation. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Antigeen-gestuurd antistof productie: studies voor *in vitro* immunisatie

Het immuunsysteem kan opgedeeld worden in een tweetal deelsystemen: de specifieke en de niet-specifieke immuniteit. Zowel het specifieke als het niet-specifieke immuunsysteem bestaan uit een cellulair en een humoraal deel. Bij de specifieke humorale immuniteit spelen antistof-vormende B cellen een centrale rol. Antistoffen zijn eiwitten en worden ook wel immunoglobulines genoemd. Ze kunnen zich met hoge specificiteit aan bijvoorbeeld infectieuze micro-organismen (antigenen) binden en deze vervolgens op verschillende wijzen onschadelijk maken. Er zijn vijf immunoglobuline (Ig) klassen of isotypes: IgM, IgD, IgG, IgA, en IgE, die nog verder in subklassen opgedeeld kunnen worden. De structuur van het "constante" gedeelte van deze moleculen is van belang bij hun functie als effector moleculen in de immuniteit.

Rijpe B cellen, net afkomstig uit het beenmerg, bezitten antigeen-receptoren (membraan-Ig of B-cel receptoren genoemd). Een humorale immuunrespons wordt geïnitieerd als een antigeen door de B cel receptor van een B cel herkend wordt. Als deze interactie in een geschikt micromilieu plaatsvindt, volgt proliferatie en differentiatie van de B-cel tot of antistof-producerende plasmacellen (primaire respons) of geheugen-B-cellen. Deze geheugen-B cellen vormen tijdens een zogenaamde secundaire respons de basis van waaruit snel bescherming tegen hernieuwde aanval door hetzelfde antigeen gerecruiteerd kan worden.

De primaire antistof respons wordt gekarakteriseerd door vooral IgM antistoffen met een relatief lage affiniteit terwijl de secundaire respons niet alleen sneller op gang komt maar ook gekenmerkt wordt door de productie van grotere hoeveelheden antistoffen, die daarnaast van het IgG, IgE of IgA isotype zijn. B cellen kunnen deze isotypes produceren na herrangschikking van hun Ig-genen (isotype switching) onder invloed van de werking van T-helper cellen. Tijdens de primaire immuunrespons gaat een subset van antigeen-geactiveerde B cellen naar de zogenaamde B-cel gebieden (follikels) in secundaire lymphoïde organen waar kiemcentrum-vorming plaatsvindt. In de kiemcentra ontstaan cycli van B-cel proliferatie en affiniteitsmaturing gevolgd door selectie van die B-cellen die de hoogste affiniteit voor het betreffende antigeen hebben ontwikkeld. Affiniteitsmaturing gebeurt door middel van somatische mutaties in het variabele segment (coderend voor het antigeen-bindende gebied) van de Ig-genen. De kiemcentrum-reactie leidt uiteindelijk tot de productie van geheugen-B cellen, of plasmablasten die vervolgens overgaan tot productie van hoog-affiene antistoffen.

Figure 1 (Hoofdstuk 2) laat een schema zien van de ontwikkeling van een B-cel tijdens een immuunrespons in een secundair lymfoid orgaan. Essentieel voor de ontwikkeling van geheugen-B-cellen of hoog affiene antistof-vormende cellen is de aanwezigheid van T-helper cellen. Antigeen-specifieke B-cel T-cel interactie ("cognate" stimulatie) vindt plaats wanneer antigeen wordt opgenomen door een B-cel, verwerkt en vervolgens gepresenteerd in associatie met MHC-klasse II moleculen aan een specifieke T-helpercel. Deze interactie leidt tot activatie van de T-cel, waarna deze cytokines (groeifactoren) zoals IL-4, IL-2 of IL-10 gaat secreteren. De cytokines zorgen, samen met de op de B- en T-cel aanwezige membraan-moleculen voor de volledige activatie en verdere differentiatie van de B-cel. Een van de oppervlaktmoleculen die belangrijk zijn bij dit proces is het CD40-molecuul op de B-cel. Binding van het CD40-molecuul aan CD40-ligand op een geactiveerde T-helpercel leidt tot B-cel proliferatie en "isotype switching". In **Hoofdstuk 2** is een overzicht van de recente literatuur op het gebied van T-cel B-cel interacties gepresenteerd. In dit hoofdstuk worden de signalen beschreven die nodig zijn om een B-cel te activeren en vervolgens te laten prolifereren en differentieren tot een specifieke antistofvormende B-cel (plasma cel). Hoe beter ons begrip van deze complexe processen tijdens een immuun respons *in vivo* is, des te doeltreffender kunnen wij ze *in vitro* toepassen.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift was gericht op de identificatie van factoren die betrokken zijn bij de ontwikkeling van antistoffen met een hoge affiniteit voor het betreffende antigeen. In het bijzonder is gekeken naar mechanismen die tot verbeterde *in vivo* of *in vitro* immunisatieprocedures zouden kunnen leiden. Hiertoe werd de rol van de B-cel-receptor en T-cel B-cel interacties bestudeerd.

De mogelijkheid om antistof producerende B-cellen onbeperkt groeivermogen te geven door ze te fuseren met myeloma cellen betekent dat uit een populatie B-cellen, klonen van cellen met één specificiteit geïsoleerd kunnen worden (hybridoma techniek). Deze kunnen vervolgens gebruikt kunnen worden voor de productie van grote hoeveelheden monoclonale antistoffen. Startpunt bij de hybridoma techniek is het verkrijgen van een populatie B cellen die de juiste antigeen-specificiteit in zich draagt. In de regel gebeurt dit via immunisatie van een geschikt proefdier, waarna hieruit de B-cellen gewonnen kunnen worden. Maar aangezien het niet altijd mogelijk is om een dier (of mens) te immuniseren met een antigeen, bijvoorbeeld vanwege de toxiciteit van een dergelijke behandeling, bestaat er grote interesse voor het *in vitro* induceren van B-cellen met de gewenste

specificiteit. In vitro immunisatie is in essentie het kweken van geïsoleerde B-cellen in een bepaald groeimedium, in de aanwezigheid van het betreffende antigeen. Hieraan kunnen andere cellen en/of mediators, die van belang zijn voor het verkrijgen van een specifieke antistofrespons tegen een bepaalde antigeen, toegevoegd worden. De opzet is om de *in vivo* situatie zo goed mogelijk na te bootsen zodat naïve of geheugen-B-cellen door in vitro manipulatie uiteindelijk antistoffen kunnen maken tegen allerlei gewenste antigenen.

Samenvatting van de in vivo en in vitro experimenten

In **hoofdstuk 3** is de invloed van een belangrijk T-helpercel afkomstig cytokine, IL-4, op de antigeen-specifieke antistofrespons *in vivo* beschreven. IL-4 is betrokken bij de activatie en proliferatie van B-lymfocyten en is (in de muis) nodig voor de isotype switch naar IgG1 en IgE. In dit onderzoek werden muizen behandeld met IL-4, voor of tijdens immunisatie met een T-cel afhankelijke antigeen. Het aantal antigeen-specifieke B-cellen werd vergeleken met die van onbehandelde dieren. In tegenstelling tot de verwachting (namelijk verhoging van het aantal antigeen-specifieke B-cellen van het IgG1 of IgE type) werd gevonden dat door IL-4 toediening het aantal specifieke B-cellen verlaagd werd. Ook in weefselcoupons van de milt van behandelde dieren werden duidelijk minder kiem centra gevonden. Een verklaring voor deze bevindingen is dat de niet-specifieke B-cellen sterk in aantal toenemen, zodat geconcludeerd kan worden dat extra toediening van IL-4 (resultierend in een overmaat) een sterke polyclonale respons induceert. Deze resultaten ondersteunen het idee dat de productie van IL-4 *in vivo* tijdens cognate T-cel B-cel interactie directioneel is en wel zodanig dat alleen de naast liggende, specifieke B-cel er het meeste van kan profiteren.

Het belang van B-cel T-cel interactie voor de specifieke B-cel respons is verder beschreven in **hoofdstuk 4**. Hierbij is gebruik gemaakt van een drager-eiwit (OVA) met daaraan gekoppeld een haptene (DNP). Als in het *in vitro* immunisatie protocol, B-cellen het DNP herkennen, dan zullen ze het hele OVA-DNP opnemen en het OVA gedeelte verwerken voor presentatie aan een extra toegevoegde OVA-specifieke T-helper-cel hybridoma. Vervolgens zal een B-cel T-cel conjugaat gevormd worden (cognate interactie) waardoor T-cel hulp aan de B-cel gegeven wordt. Gebruik van dit model-antigeen voor het *in vitro* immuniseren of stimuleren van muizenmilt afgeleide B-cellen resulteerde in de vorming van aanzienlijk meer DNP-specifieke B-cellen dan wanneer DNP werd gekoppeld aan een niet-relevant dragereiwit of als er geen T-hybridoma cellen aanwezig waren.

Deze resultaten laten zien dat een universeel drager-eiwit en bijbehorende specifieke T-helperhybridoma gebruikt zouden kunnen worden om een betere antigeen-specifieke B-cel respons te verkrijgen. Voorwaarde hiervoor is wel dat de drager gekoppeld wordt aan het antigeen waartegen de B-cel respons moet worden opgewekt.

In **hoofdstuk 5** is een verdere verfijning van de procedure voor de *in vitro* stimulatie van antigeen-specifieke humane B-cellen beschreven. Er is hierbij gebruik gemaakt van een kweekstelsel waarbij zowel monoklonale antistoffen gericht tegen het CD40-molecule op de B-cel als een aantal T-helpercel afkomstige cytokines aanwezig zijn. Bekend is dat met dit stelsel, B-cellen lang in kweek gehouden kunnen worden zonder de feitelijke aanwezigheid van T-helpercellen. Afhankelijk van welke cytokines toegevoegd worden kan voornamelijk proliferatie (IL-4) of differentiatie (IL-2/IL-10) van B-cellen verkregen worden. Het doel van het door ons gekozen protocol was antigeen-specifieke geheugen-B cellen te stimuleren in aanwezigheid van antigeen en een antistof gericht tegen het anti-CD40-molecule, waarbij eerst proliferatie van deze B-cellen en vervolgens antistofproductie geïnduceerd wordt. Als klinisch relevant antigeen werd cytomegalovirus (CMV) uitgekozen. In het protocol werden geheugen-B-cellen van CMV-seropositive donoren geïsoleerd en gestimuleerd met CMV. Er werd goede B-cel proliferatie and antistof productie verkregen. Echter er werden slechts lage concentraties CMV-specifieke antistoffen gemeten en hiervoor was pre-selectie van CMV-specifieke B cellen en 14 dagen kweek noodzakelijk. Het lijkt aannemelijk dat de continue aanwezigheid van antistoffen gericht tegen het CD40-molecule, of het antigeen zelf, de specifieke antistofrespons in het protocol blokkeren.

In het volgende hoofdstuk (**hoofdstuk 6**) is de antistofproductie van B-cellen tijdens gelijktijdige B-cel receptor en CD40 stimulatie verder onderzocht. Om de B-cel receptor op alle in de assay aanwezige B-cellen te triggeren is gekozen voor een polyklonale B-cel stimulator, *Staphylococcus aureus* Cowan I (SA). De resultaten lieten zien dat, in de aanwezigheid van de cytokines IL-2 en IL-10, er aanvankelijk een voorkeur voor proliferatie boven antistofproductie te vinden was. In de tweede week werd een geleidelijke toename in antistofproductie gemeten, onder invloed van de aanwezige SA en opnieuw toegevoegde cytokines. Hieruit kunnen wij concluderen dat via de B-cel receptor gestimuleerde B-cellen (door antigeen of SA) tot proliferatie geïnduceerd kunnen worden in aanwezigheid van antistof gericht tegen het CD40-molecule, een respons die versterkt wordt door de

aanwezigheid van cytokines. Verder blijkt rijping tot plasma cellen te gebeuren via een CD40-onafhankelijk route.

In dit hoofdstuk is ook het gebruik van synoviocyten als "feeder"-cellen beschreven en hun mogelijke rol in de stimulatie van B-cel antistofproductie bediscussieerd.

In **Hoofdstuk 7** worden de bevindingen van dit proefschrift bediscussieerd en is tevens een kort overzicht gegeven van de technieken die op dit moment in de literatuur gebruikt worden om antigeen-specifieke B-cellen te induceren en/of te verrijken.